ウェブサイト公開用

（様式 10）
（海外特別研究員事業）
令和 2 年 7 月 30 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長　殿

採用年度　平成 31 年度
受付番号　201960078
氏　　名　秋山 慎太郎
（氏名は必ず自署すること）

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。
なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地：　シカゴ　（国名：　米国　）

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。
ディープシークエンス法による炎症性腸疾患惹起細菌の検索

3. 派遣期間：令和　元　年　7　月　1　日　～　令和　2　年　6　月　30　日

4. 受入機関名及び部局名
シカゴ大学消化器内科

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意　**書式任意（A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可）**
（研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等）
（注）「6. 研究発表」以降については様式 10－別紙 1～4 に記入の上、併せて提出すること。

研究遂行状況及び成果の概要

炎症性腸疾患(IBD)は、腸に慢性の炎症をきたす病態で、近年、日本を含むアジア諸国で患者数が急増している。その原因は依然として不明であるが、IBD 患者では、腸内細菌叢のバランス失調(Dysbiosis)が確認されていることから、その発症には何らかの腸内細菌種が寄与していると考えられる。腸内細菌解析において、糞便細菌がもつ 16S rRNA 遺伝子を次世代シークエンサー(MiSeq)で解析する方法が一般的である。しかし、腸内細菌種は、食事や治療薬などの外的因子により大きく影響を受けるため、この従来法では、IBD 発症に寄与する細菌種を同定するには限界があると考えられる。そこで、本研究では、IBD 惹起細菌をより特異的に同定するため、新規の腸内細菌解析法の開発に取り組んでいる。

IBD の代表疾患であるクローン病の免疫病態で重要な役割を担う Th1 細胞は、貪食細胞、中でも樹状細胞によって誘導されることが知られている。樹状細胞は、腸の粘膜固有層(LP 層)に存在し、外来の細菌やウイルスを貪食し、全身の免疫反応を惹起する役割を担う。クローン病患者では、貪食細胞が、抗原提示あるいはサイトカインを介して、ナイーブ T 細胞を Th1 細胞に誘導することが確認されている(引用 1)。このことから、我々は、貪食細胞が、IBD 発症に関わる細菌種を貪食、抗原提示することで、病態に特異的な T 細胞サブセットを誘導し、IBD を惹起するという着想に基づき、貪食細胞内細菌 DNA を解析することで、IBD 惹起細菌を同定すべく、以下の実験を進めている。

(1) IBD 患者の LP 層由来免疫細胞(LP 細胞)の回収

現在までに、15 例の IBD 患者(潰瘍性大腸炎 8 例、クローン病 7 例)から同意を得て、大腸内視鏡生検検体を回収した。各患者から約 5-6 個の生検組織を回収し、1mM EDTA 処理により上皮細胞層を除き、IV 型コラーゲナーゼ(0.5mg/ml)で組織を溶解し、LP 細胞を回収した。この方法により平均 1.0×10^6 個の LP 細胞が回収されることが確認された。非活動性粘膜と比較し、活動性粘膜のほうが、LP 細胞がより多く回収されることも分かった (表 1)。

表 1. 患者背景と各実験過程で得られた細胞数

#	Age (y/o)	Gender	Disease	Current treatments	HBI	SCCAI	SES-CD	Endoscopic Mayo Clinical Score	Location of biopsy	Activity at location of biopsy	# of Biopsy	Frozen Stock	# of LP cells	# of Lin(-)CD11c(+) HLA-DR (+) cells	16S sequencing
1	60	F	CD	Mesalamine	6	NA	0	NA	Right colon	non-active	6	Yes	0.8×10^6	811	Waiting
2	72	F	UC	Sulfasalazine	NA	0	NA	2	Sigmoid colon	active	6	Yes	1.5×10^6	7768	Done
3	53	M	UC	Adalimumab Azathioprine	NA	0	NA	0	Ascending colon	non-active	6	Yes	0.8×10^6	2780	Waiting
4	71	M	CD	Ustekinumab	0	NA	6	NA	Terminal ileum	active	4	Yes	0.7×10^6	4291	Waiting
5	57	M	UC	Vedolizumab	NA	0	NA	1	Ascending colon	active	6	Yes	0.8×10^6	569	Waiting
6	41	M	CD	Vedolizumab	0	NA	3	NA	Terminal ileum	active	6	Yes	1.4×10^6	1001	Done
7	61	F	CD	Infliximab	1	NA	2	NA	Ascending colon	non-active	6	Yes	1.0×10^6	962	Waiting
8	68	M	UC	Mesalamine	NA	0	NA	0	Ascending colon	non-active	6	Yes	0.25×10^6	458	Waiting
9	64	F	CD	Adalimumab Prednisone	7	NA	9	NA	Neo terminal ileum	active	5	No	3.4×10^6	NA*	NA*
10	42	F	UC	Tofacitinib	NA	4	NA	2	Rectum	active	6	No	1.7×10^6	NA*	NA*
11	25	F	CD	Vedolizumab Methotrexate	2	NA	6	NA	Left colon	active	6	No	1.0×10^6	NA*	NA*
12	20	F	UC	Infliximab	NA	0	NA	2	Sigmoid colon	active	6	No	1.7×10^6	8904	Done
13	21	M	UC	Adalimumab	NA	0	NA	2	Transverse colon	active	6	No	1.8×10^6	10000	Waiting
14	32	M	UC	Adalimumab	NA	3	NA	1	Ascending colon	active	6	No	0.8×10^6	NA*	NA*
15	33	M	CD	Adalimumab	0	NA	0	NA	Transverse colon	non-active	6	No	0.5×10^6	2012	Waiting

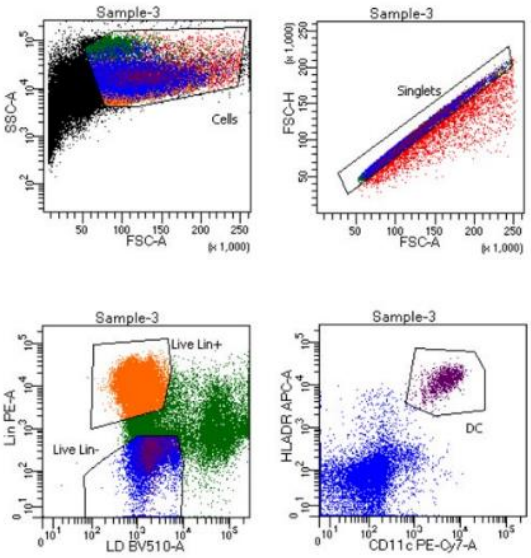
UC, ulcerative colitis; CD, Crohn's disase; HBI, Harvey-Bradshaw Index; SCCAI, Simple clinical colitis activity index; SES-CD, Simple endoscopic score for Crohn's disease
* Sample #9, #10, #11, #14 は、全サンプルを条件検討に使用したため、ソーティング実験は実施していない。

(2) LP 細胞中の貪食細胞同定とソーティング

まず、フローサイトメトリー(BD FACS Canto)を用いて、LP 細胞中の貪食細胞の同定を試みた。全細胞から生細胞のみを識別するために、Aqua dead cell strain kit (Thermo Fisher Scientific)を用いた。細胞表面マーカーとして CD3/16/19/20 (Lin)を用い、LP 細胞を、リンパ球を含む Lin 陽性細胞と、貪食細胞を含む Lin 陰性細胞に分別した。次に、CD11c、HLA-DR を表面マーカーとして、Lin 陰性細胞から樹状細胞とマクロファージを含む貪食細胞(CD11c 陽性 HLA-DR 陽性細胞)を同定した(図 1、DC)。結果、平均 1.0×10^6 個の LP 細胞から、平均 7,000 個の貪食細胞を同定できることが確認された。

次に、セルソーター(BD FACS Aria)を用いて、LP 細胞から貪食細胞のソーティングを実施した。現在までに、11 検体のソーティングを完了しており、平均 3,600 個の貪食細胞が回収された。貪食細胞数は、LP 細胞回収後の凍結処理により減少することが判明したため、ソーティング実験は、LP 細胞回収直後に実施する方針とした(表 1)。

図 1. サンプル#3 のソーティングデータ



Tube: 3			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	144,896	####	100.0
Cells	62,853	43.4	43.4
Singlets	59,907	95.3	41.3
Live Lin-	11,650	19.4	8.0
DC	1,128	9.7	0.8
Live Lin+	33,226	55.5	22.9

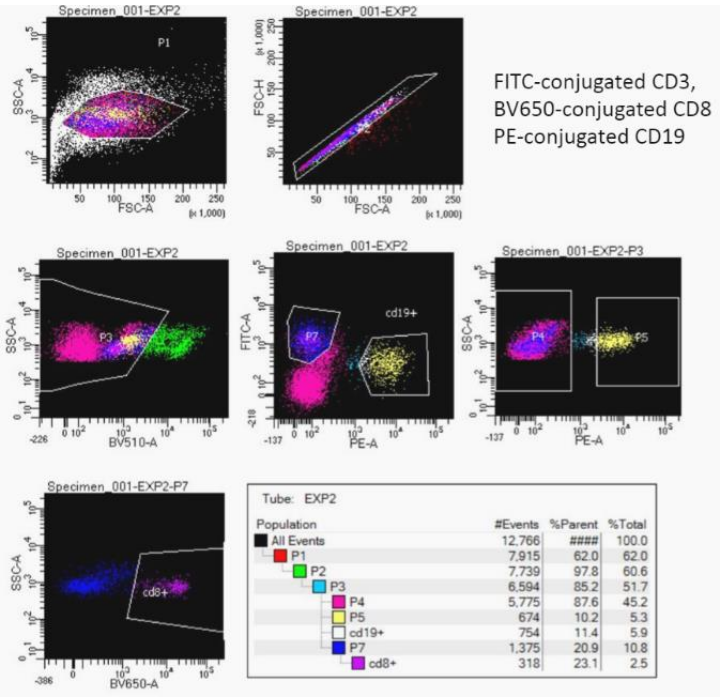
(3) ネガティブコントロールの樹立

貪食細胞内に内包すると考えられる微量な細菌 DNA を同定するためには、適切なネガティブコントロールを設定し、シークエンスデータを比較検討することが重要と考えられる。

貪食能のない免疫細胞、すなわち、T 細胞、B 細胞、または Lin 陽性細胞がその候補になるという着想のもと、IBD 患者の腸生検検体から T 細胞(CD3 陽性 CD8 陽性細胞)と B 細胞(CD19 陽性)の回収を行った(図 2)。1 検体のみの検討ではあるが、約 0.8×10^6 個の LP 細胞から回収された T 細胞、B 細胞数はそれぞれ約 10,000 個、24,000 個であった。また、Lin 陽性細胞も十分に回収できることを確認している。

また、血液検体を用いて T 細胞、B 細胞の回収も実施した。ACK buffer で 1ml の血液を溶血後、遠心して回収された末梢血単核球数は、約 1.0×10^8 個で、そこからソーティングされた T 細胞、B 細胞数はそれぞれ約 4,300 個、約 670 個であった。血液については、T 細胞、B 細胞の回収率が予想以上に低いため、末梢血単核球回収法やソーティングにおける条件検討を行っている。

図 2. サンプル#14 の FACS データ



(4) IBD 患者由来貪食細胞のゲノム DNA 抽出と 16S rRNA 遺伝子のシークエンス解析

AllPrep DNA/RNA Micro Kit (QUIAGEN)を用い貪食細胞からゲノム DNA を回収した。貪食細胞(11 検体)から回収された DNA の平均収量は 122 ng であった。これを鋳型にして、16S rRNA 遺伝子の V4 領域を PCR により増幅し、ライブラリ作成後、MiSeq により網羅的な 16S シークエンス解析を行っている。

まず、貪食細胞内細菌の有無を確認する目的で、サンプル#2, #6, #12 の 16S データを取得、QIIME2 によりデータ解析を実施し、Greengenes database (https://greengenes.secondgenome.com/)との相同性検索を行うことで、細菌種を同定した。図 3 に結果を示す。各サンプルで確認される茶色の配列は、相同性検索の結果、細菌種が特定できなかったものであり、ヒトミトコンドリア由来の配列である。それ以外の色で示されている配列は、細菌由来であることから、3 検体すべてで、細菌由来の配列が確認され、細菌種が同定された。全ての検体で共通して確認される細菌種は、*Clostridium* であった。

図 3. 16S データ解析結果

次に、ネガティブコントロールである T 細胞、B 細胞、Lin 陽性細胞を含む 27 検体 (潰瘍性大腸炎 4 例、クローン病 4 例)のシークエンス解析を施行した(表 1)。現在、データを待っている段階であるが、今後、ネガティブコントロールとの比較検討により、上記 3 検体で検出された細菌種が、IBD 患者の貪食細胞特異的に検出されるものなのかを検討していく予定である。

最後に

我々の解析法は、細菌そのものではなく、貪食細胞内に存在する細菌 DNA に着目しているため、糞便細菌を解析する従来法よりも、外的因子による影響が少ないと期待される。さらには、IBD の免疫機序に即した解析法であるため、より病態特異的な細菌種の同定が可能なのではないか考えている。腸内細菌叢の多様性が低下している IBD 患者では、*Firmicutes* 門、特に *Clostridium* の減少が報告されていることから(引用 2)、今回の我々の解析結果は、貪食細胞が IBD 病態に寄与する細菌

を内包している可能性を示唆するものであり、非常に興味深い。

COVID-19 のパンデミックによる影響で、2020 年 3 月以降、実験の中断を余儀なくされてしまい、研究が思い通り進まない状況が続いた。6 月後半に入ってから、ある一定の条件であれば、患者リクルートやラボでの実験が許容されるようになってきており、今後も、可能な限り、詳細な解析を行っていく予定である。

引用文献

1. Sakuraba A et al. Gastroenterology 2009; 137(5): 1736-1745.
2. Matsuoka K et al. Semin Immunopathol. 2015; 37 (1): 47-55.